

### Оценка поставщиков родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда с использованием метода ОФ ВЭЖХ

Носикова Л. А., канд. хим. наук, доцент кафедры химии и технологии редких и рассеянных элементов и наноразмерных композиционных материалов МИТХТ им. М. В. Ломоносова, 119571, Москва, пр-т Вернадского, 86, Россия

Кочетов А. Н., канд. хим. наук, химик-аналитик испытательной аналитической лаборатории ЗАО «МЕТТЭМ-Технологии», 143900, Балашиха, ул. Парковая, 3, Россия

Рассмотрена возможность оценки поставщиков родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда (бродифакум, дифенакум, флокумафен, бромадиолон) с привлечением метода ОФ ВЭЖХ. Установлены оптимальные условия и пределы определения изомерного состава в субстанциях (дифенакум, флокумафен и бродифакум), в том числе и для композиций на основе шести производных. На основании анализа хроматографических данных предложены экспресс-оценка токсичности родентицидов и рейтинговая оценка поставщиков субстанций.

**Ключевые слова:** родентициды, субстанции, ОФ ВЭЖХ, пест-контроль, *цис-*, *транс-*, дифенакум, бродифакум, флокумафен, бромадиолон, определение содержания

Родентицидные субстанции 4-гидроксикумаринового ряда производят за пределами Таможенного союза [5]. Наличие значительного числа предложений на рынке субстанций выводит входной контроль сырья на новый уровень. В настоящее время даже на одном сайте (не являющемся торговой интернет-площадкой) можно найти [18] предложения от десятков только китайских поставщиков родентицидных субстанций: дифенакум [19], бромадиолон [54], бродифакум [49] и флокумафен [6].

Обилие предложений на рынке субстанций позволяет не только проводить мониторинг сырья и выстраивать финансовые взаимоотношения с поставщиками субстанций, но и выбирать продукцию с более высокими характеристиками по избирательной токсичности. Оценка токсичности осуществляют при использовании прямых методов биоконтроля [8], однако погрешность данных методов, как правило, высока, в то же время срок получения результатов растягивается на недели и стоимость подобного мониторинга значительна.

Альтернативно можно оценивать сырье по важнейшим характеристикам (концентрации и относительной токсичности), исходя из хроматографических данных об изомерном составе и литературных данных о токсичности изомеров и субстанций. Стоимость такой оценки существенно ниже официальной, экспрессность – выше [8], кроме того появляется возможность получать паспорт субстанции (по сути хроматограмму), которая может служить репером при арбитражном анализе образцов готовой продукции, поскольку изомерный состав остается неизменным в ис-

ходных субстанциях, премиксах, а также в готовых средствах.

В статье представлены результаты анализа некоторых доступных образцов субстанций/стандартных образцов методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на предмет установления изомерного состава. В процессе исследования нами были рассмотрены условия определения изомерного состава, особенности приготовления растворов, интерпретированы хроматографические данные на основании мирового опыта анализа родентицидных субстанций.

Необходимо чуть подробнее остановиться на явлении изомерии производных 4-гидроксикумаринов, для которых наличие хиральных центров в структурах обеспечивает существование нескольких энантиомерных (оптически активных) форм. Например, для куматетралила, имеющего один хиральный центр, возможны две изомерные формы (*S* и *R*). Для производных куматетралила (рис. 1) наличие двух таких центров обеспечивает существование уже четырех форм, которые можно сгруппировать по конфигурации объемных заместителей на *цис-* и *транс-*. Полное разделение оптических изомеров осуществляют с привлечением дорогостоящего специального оборудования и стационарных (хиральных) фаз [10, 11, 14, 22, 26, 30, 33, 39]. Для оценки поставщиков достаточно ограничиться определением содержания геометрических изомеров (*цис-* и *транс-*). Литературные данные по биологической активности изомерных форм (табл.) свидетельствуют о заметном отличии только дифенакума, тогда как для дру-

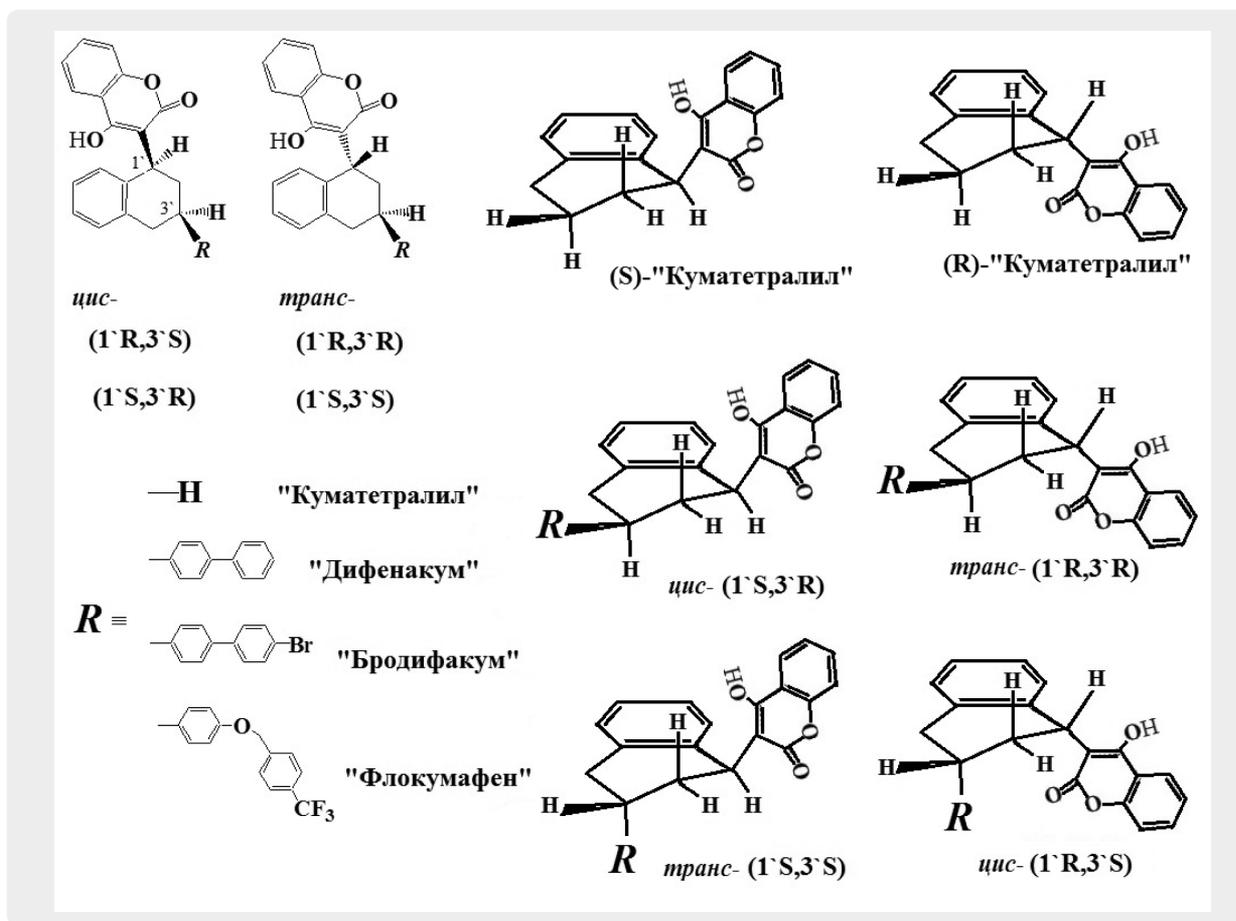


РИС. 1. Оптическая изомерия для производных подгруппы Куматетралила

гих производных разница или минимальна или же недостаточно данных. Авторы [38] декларируют более высокую токсичность для *транс*-изомеров бродифакума и флокумафена.

Одновременно с пониманием различия в токсичности изомеров трансформировались подходы к синтезу родентицидов группы 4-гидроксикумарина. Так, при синтезе титульных соединений изначально использовались схемы получения, не обеспечивающие региоселективность [15, 17, 32]. Позднее пришлось одновременно решать задачи уменьшения количества стадий, увеличения конечного выхода продуктов, разделения геометрических изомеров на стадии прекурсоров [24, 31, 35] и конечных производных [38] с переходом к стереоспецифичному синтезу этих соединений [25, 36]. Между тем при покупке субстанции возникает вопрос: насколько инновационные методы синтеза/очистки используются для ее получения и, соответственно, какими токсикологическими характеристиками будет обладать предлагаемая субстанция.

Аналитическая задача определения титульных производных в различных объектах ранее обсуж-

далась [4], однако далеко не всегда удается одновременно с количественным определением содержания субстанции установить их изомерный состав. Например, определение содержания дифенакума реализуется методом ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [12, 13, 16, 23, 29], но только в нескольких случаях достигается разрешение изомеров с использованием градиентного элюирования и флюориметрического [27] и УФ-детектирования [20].

В случае анализа смесевых композиций, содержащих несколько действующих веществ, задача определения изомерного состава усложняется за счет наложения аналитических сигналов на хроматограммах. Ранее нами были подробно описаны [4] условия одновременного извлечения из модельных композиций на основе пшеничного теста с последующим определением методом ОФ ВЭЖХ трех антикоагулянтов 4-гидроксикумаринового ряда: зоокумарин, бромадиолон и *цис*-, *транс*-изомеров субстанции бродифакум. При наличии в составе таких модельных систем дополнительно дифенакума корректное определение в условиях [4] осуществить не-

Таблица

Токсичность антикоагулянтных родентицидов производных 4-гидроксикумарина для крыс

Соединение CAS Number	Энантиомерный состав	LD <sub>50</sub> (мг/кг)	Литература
Дифенакум [56073-07-5]	транс- (1`R,3`R)	2.5-5.0	[37]
	транс- (1`S,3`S)	0.8-1.5	
	цис- (1`S,3`R)	2.5-5.0	
	цис- (1`R,3`S)	0.3-0.9	
	Рацемат*	0.3-1.8/0.9-0.7*	[34]
	Рацемат	1.8	[17]
Зоокумарин [81-81-2]	Рацемат	37.5	[2]
		14.0	[1]
Куматетралил [5836-29-3]	Рацемат	15	[2]
		16.5	[1]
Бродифакум [56073-10-0]	транс- (1`R,3`R)	0.5-0.8	[37]
	транс- (1`S,3`S)	0.4-0.9	
	цис- (1`S,3`R)	0.4-0.9	
	цис- (1`R,3`S)	0.5-0.8	
	Рацемат	0.20-0.37/0.30-0.63**	
	Рацемат	0.27	[17]
	Рацемат	0.47-0.53	[2]
Бромадиолон [28772-56-7]	Рацемат	0.46	[17]
		1.3	[1]
Флокумафен [90035-08-8]	Рацемат	0.25-0.56/0.79-2.4*	[28]
		0.46	[1]

\* смесь оптических изомеров неизвестного изомерного состава

\*\* для крыс/мышей

возможно из-за наложения групп сигналов. Вместе с тем задача совместного определения в родентицидных препаратах нескольких производных крайне актуальна, т. к. в последнее время наметилась тенденция усложнения состава готовых родентицидных приманок с целью увеличения эффективности и преодоления возможной резистентности грызунов к одному из действующих веществ. Последнее обстоятельство заставляет иначе рассматривать и тактику использования родентицидных приманок, поскольку смесевые композиции на основе нескольких производных могут служить реальной альтернативой повторным обработкам с чередованием приманок на основе разных субстанций [7].

### Материалы и методы

Для проведения исследований использовали следующие аналитические стандарты: Дифенакум 99,2% (Fluka, Англия), Варфарин («Зоокумарин») 97,5% (СОП 64-06, НПК «Блок-1», Россия), Бродифакум 97,8% (СОП 68-06, НПК «Блок-1», Россия), Бромадиолон 98,2% (СОП 65-06, НПК «Блок-1», Россия), Куматетралил 99,9% (Bayer AG, Германия), Флокумафен 98,0% (Wausome Pharmaceutical Co., Ltd, Китай), Флокумафен 96,4% (Kukbo Science Co., Ltd, Корея), Фентион 98,5% (СОП 115-12, НПК «Блок-1», Россия),

Изопропанол (х. ч., ГОСТ 18300-87), метанол (для ВЭЖХ, Lab-Scan analytical sciences, Польша), уксусная кислота (х. ч., ГОСТ 61-75), вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72) и ацетонитрил (для ВЭЖХ, Panreac, Испания) использовались без предварительной очистки. Для приготовления модельной тестовозобразной приманки использовали Дифенакум (Hangzhou Yuhao Chemical Technology Co., Ltd, Китай) с содержанием основного компонента 98%, а также ряд других родентицидных субстанций китайского производства с заявленным содержанием основного компонента не ниже 95%.

Проведение ВЭЖХ в сочетании с УФ детекцией проводили на хроматографе Waters 490 (Waters Ltd, Watford, UK), оснащенном насосом Altex модели 110A, инжектором Rheodyne с объемом петли 20 мкл, УФ-детектором модели 490 с переменной длиной волны. Использовали колонки из нержавеющей стали (4.0×150 мм), заполненные Сепарон SGX C18 Супер (RP-S), зернение 5 мкм («Элсико», Россия); Сепарон SGX C18 Супер, зернение 5 мкм («Элсико», Россия) и (4.6×250 мм), заполненную Zorbax ODS, зернение 5 мкм (Agilent Technologies Inc, США). Подвижные фазы (состав указан в подписи к хроматограммам) ацетонитрил – вода, ацетонитрил – вода – уксусная кислота и

метанол – вода – уксусная кислота, скорость потока 0.5 мл/мин (предварительно дегазировали при помощи ультразвуковой установки). Детекцию осуществляли на УФ-детекторе при 280 нм (температура комнатная). Запись хроматограмм проводили с помощью программы «Мультихром» (Ampersand Ltd версия 1.52i, Россия).

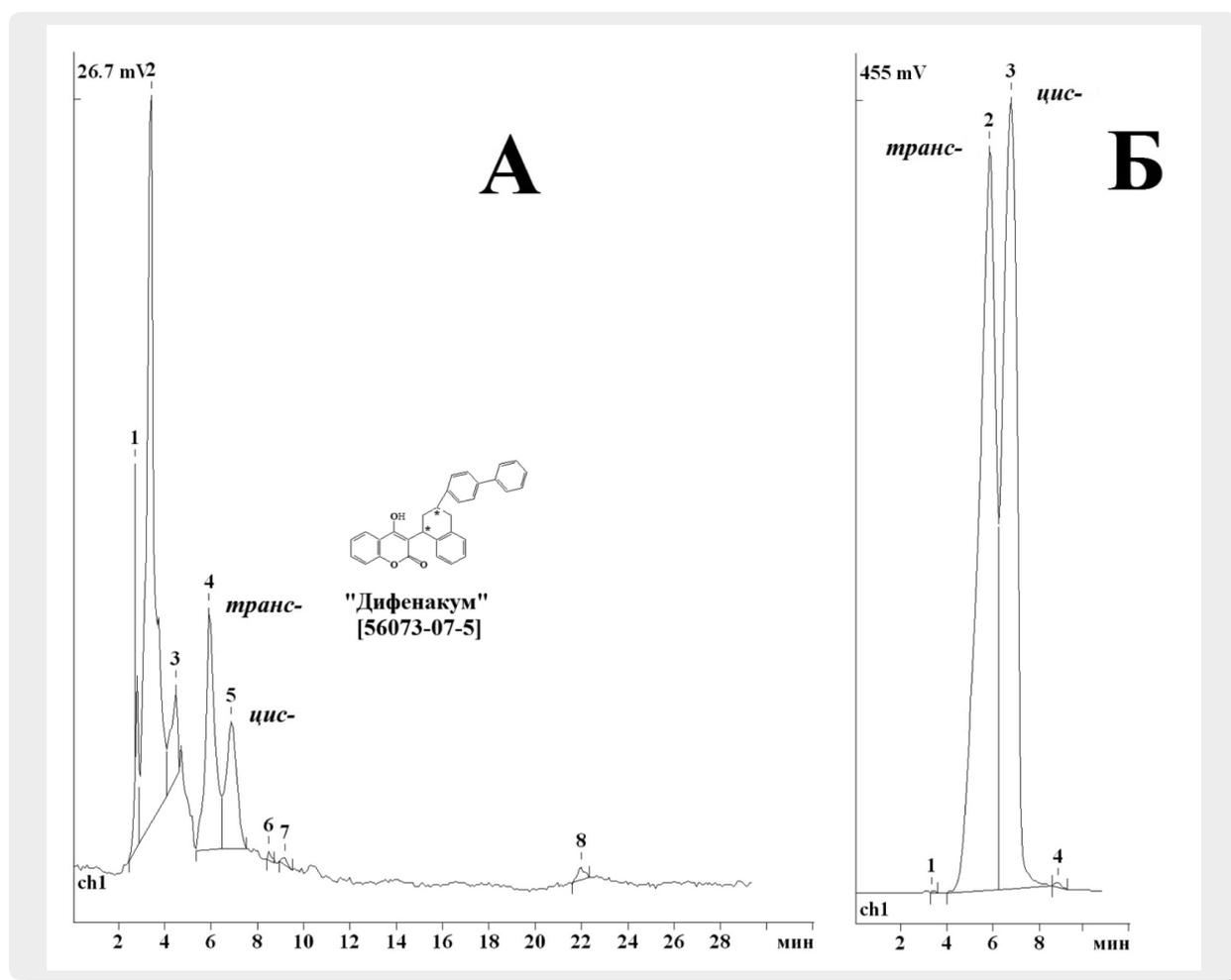
Исследовали модельный раствор смеси родентицидов с концентрациями компонентов: зоокумарин – 0.0012 мг/мл (3.89 мкМ); куматетралил – 0.0018 мг/мл (6.16 мкМ); бромодиолон – 0.0017 мг/мл (32.5 мкМ); дифенакум – 0.0012 мг/мл (2.70 мкМ); флюкумафен – 0.0015 мг/мл (27.6 мкМ) и бродифакум – 0.0040 мг/мл (7.58 мкМ), а также другие модельные растворы и растворы технических субстанций.

В процессе исследования подвергалась проверке на содержание ДВ оригинальная тестовая композиция на основе пшеничной муки [4], со-

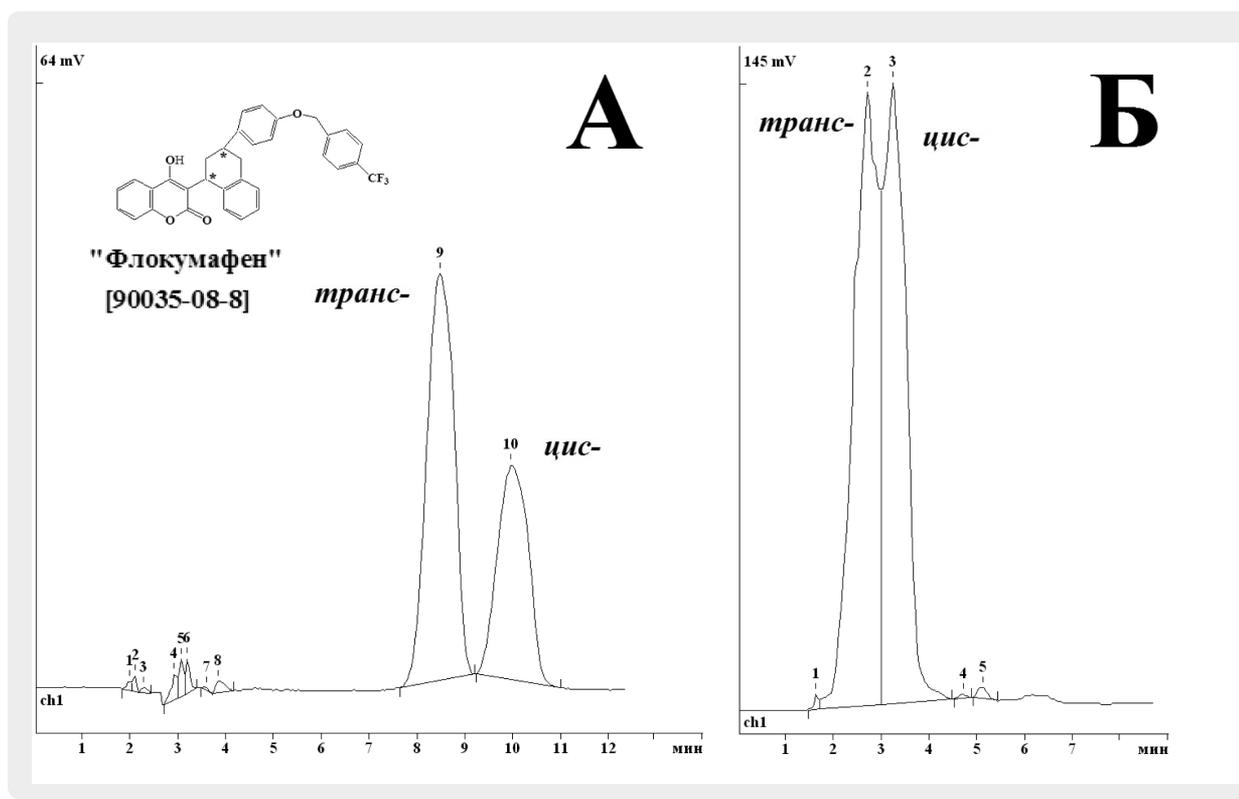
держащая 0.005% родентицидной субстанции дифенакум. Определение ДВ осуществлялось при использовании экстракционной системы и условий, ранее подобранных нами для одновременного извлечения зоокумарина, бромодиолон и бродифакума [4].

### Результаты и обсуждение

В утвержденном документе [8] рекомендовано использовать метод ОФ ВЭЖХ для титульных соединений, однако не указывается возможность проводить оценку изомерного состава. Между тем оценка содержания максимально активных изомеров в субстанциях может служить одним из важнейших критериев при отборе тех или иных производителей действующих веществ дезинфекционных средств, т. е. может являться базовым при внедрении процедуры оценки поставщиков в рамках ISO 9001.



**Рис. 2.** Хроматограмма образца препарата, содержащего Дифенакум (пробоподготовка осуществлена по методу [4]) (А) и стандартного раствора Дифенакум в изопропанолe с концентрацией 0.72 мг/мл (Б). Колонка 4.6×250 мм Зорбакс ODS, 5 мкм. Система CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (80:20); λ = 310 нм; 0.5 мл/мин



**Рис. 3.** Хроматограмма стандартных растворов субстанции Флокумафен производства Fluka, Англия – 0.038 мг/мл (А) и Kukbo Science Co, Ltd, Корея – 0.146 мг/мл (Б). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер(RP-S), 5 мкм. Система  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (80:20);  $\lambda = 280$  нм; 0.5 мл/мин (для А). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер, 5 мкм. Система  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (70:30);  $\lambda = 280$  нм; 0.5 мл/мин (для Б).

Ранее мы рассмотрели варианты пробоподготовки для большинства форм родентицидных препаратов [4]. Важно использовать органические растворители, которые смешиваются с подвижной фазой при хроматографическом определении, а также необходимо учитывать возможность трансформации субстанций вследствие протекания таутомерных превращений, изомеризации и обменных процессов с сольвентами, что может заметно снизить как разрешение, так и общую чувствительность определения [4]. Наиболее универсальными оказались системы на основе хлороформа и изопропанола. В хлороформе хорошо растворяются все исследованные субстанции, что и было использовано для приготовления премиксов анализируемых растворов с концентрациями 2–10 мг/мл. Разбавлением премиксов изопропанолом до концентраций 0.01–0.3 мг/мл удается получить стабильные растворы (хранение 2 месяца в холодильнике  $T=2\pm 6^\circ\text{C}$ ) для аналитического определения методом ОФ ВЭЖХ с широким охватом полярностей подвижной фазы. Аналитические стандартные растворы готовят в соответствии с нор-

мативной документацией, прилагающейся к стандартному образцу (смеси изомеров с аттестованным значением содержания в случае импортных аналитических стандартов).

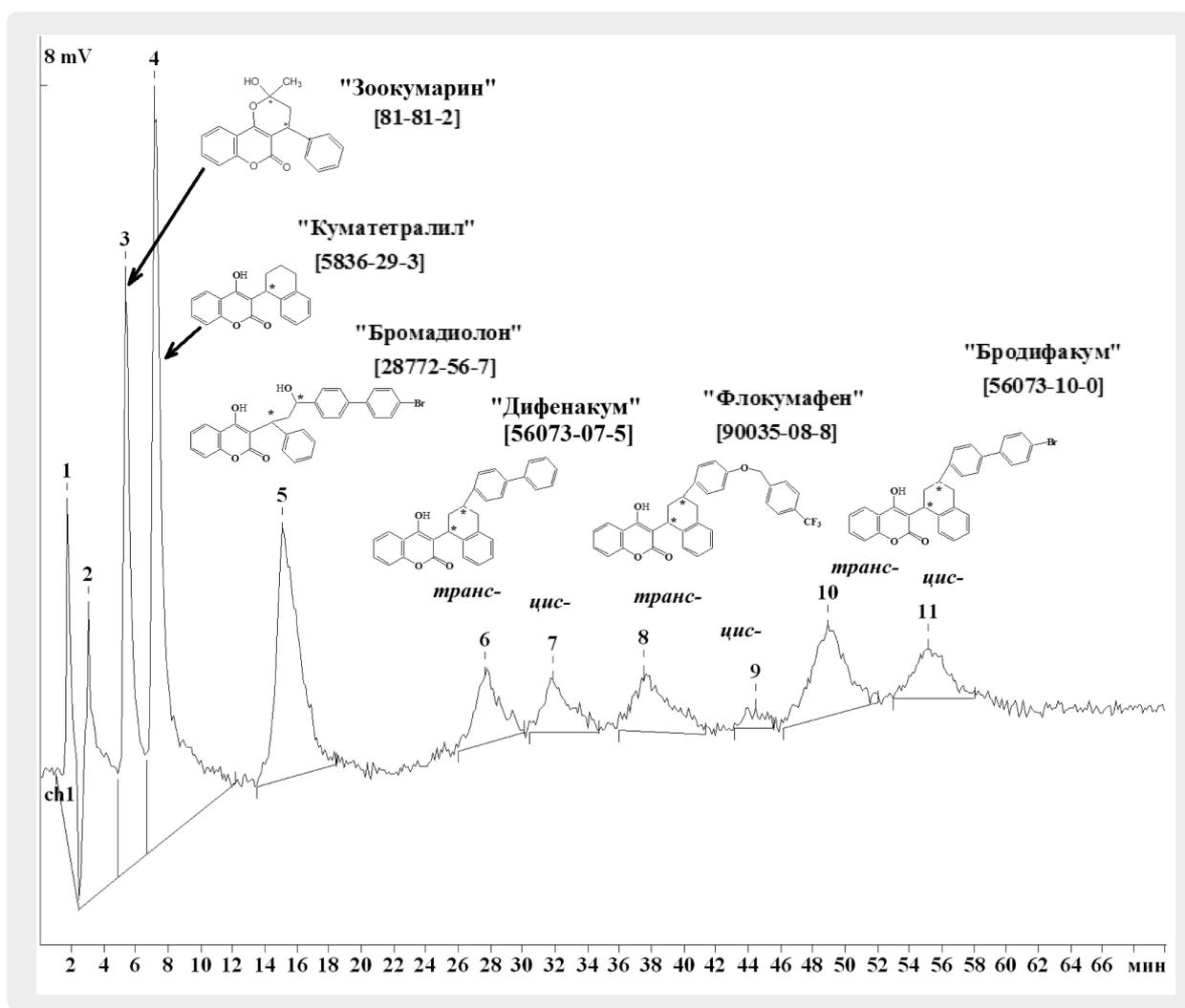
В зависимости от задачи пробоподготовка и хроматографический метод должны быть скорректированы для рационального использования ресурсов (трудозатрат, расходных материалов, износа оборудования). Например, при анализе содержания субстанции достаточно приготовить премикс средства (2–10 мг/мл) и рабочий раствор на его основе с концентрациями 0.1–0.3 мг/мл, осуществляя хроматографирование в менее полярных условиях (рис. 2Б, 3, 5В). В случае готовых родентицидных средств или препаратов на основе нескольких производных необходимо подбирать экстракционные условия [4] и осуществлять анализ в более полярных системах (с большим содержанием воды в составе подвижной фазы). Это особенно важно при извлечении целевых компонентов из пищевых матриц.

Для рутинного определения содержания индивидуальных субстанций этого ряда (например ди-

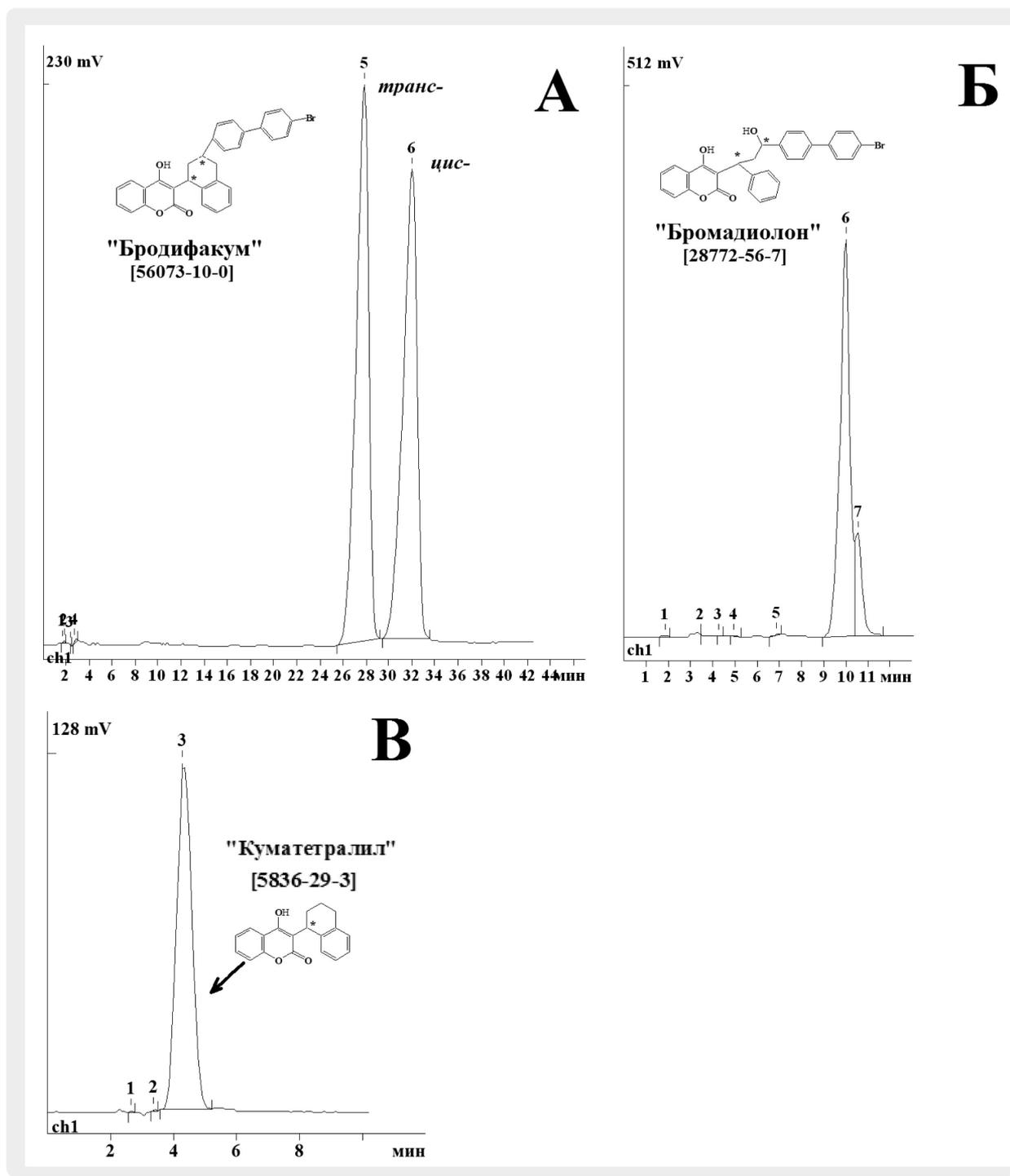
фенакума) в готовых родентицидных композициях оптимально использование высокоэффективных колонок (в нашем случае Zorbax ODS 4.6×250 мм), с менее полярными элюентами на основе ацетонитрила (ацетонитрил – вода (80:20)). Извлекаемые из пищевой матрицы компоненты не мешают идентификации субстанций, а полярности подвижной фазы оказывается достаточно для определения изомерного состава и вместе с тем обеспечивается большая робастность определения за счет сокращения времени проведения хроматографического анализа. Выполнение процедуры анализа по представленной выше схеме позволяет существенно сократить время определения Дифенакума (с 35 мин. (см. рис. 4) до 8 мин. (см. рис. 2А).

Использование менее эффективных хроматографических систем (в нашем случае Сепарон SGX C18), при сохранении постоянного размера зерна сорбента, позволяет оценивать изомерный состав субстанции (рис. 3АБ, 4, 5АБ), однако для определения в готовых средствах, требуется значительно большее время элюирования [4].

Удовлетворительное разделение всех (рис. 4) исследованных производных ряда 4-гидроксикумарина с сохранением селективности, высокой чувствительности (на уровне менее 0.0002%) и относительно небольшом времени анализа было достигнуто при использовании более полярных (чем в [4]) элюирующих систем в изократическом режиме. Оптимальные условия были по-



**Рис. 4.** Хроматограмма модельной смеси антикоагулянтных родентицидов 4-гидроксикумаринового ряда (Зоокумарин – 0.0012 мг/мл (2.70 мкМ); Куматетралил – 0.0012 мг/мл (3.89 мкМ); Бромадиолон – 0.0018 мг/мл (6.16 мкМ); Дифенакум – 0.0040 мг/мл (7.58 мкМ); Флокумафен – 0.0015 мг/мл (27.6 мкМ) и Бродифакум – 0.0017 мг/мл (32.5 мкМ)). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер(RP-S), 5 мкм. Система  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (60:40);  $\lambda = 280$  нм; 0.5 мл/мин.



**РИС.5.** Хроматограмма стандартных растворов (ГСО) субстанций бродифакум – 0.66 мг/мл (А), бромодиолон – 0.46 мг/мл (Б) и стандарта куматетралила (Bayer AG) – 0.048 мг/мл (В). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер(RP-S), 5 мкм. Система CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (70:30:0.5); λ = 280 нм; 0.5 мл/мин (для А и В). Колонка 4.0×150 мм Сепарон SGX C18 Супер, 5 мкм. Система CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (70:30); λ = 280 нм; 0.5 мл/мин (для Б).

лучены с использованием колонки Сепарон SGX C18 Супер (RP-S) 4.0×150 мм и системы ацетонитрил – вода (60:40), при этом возможно груп-

повое определение содержания шести родентицидных субстанций в модельном растворе (включая установление состава геометрических изомер-

ров для трех из них). Указанные концентрации модельных растворов (рис. 4) являются пороговыми для определения изомерного состава, поскольку при слишком большой разнице между содержанием геометрических изомеров (в случае флюкумафена соотношение *транс*-/*цис*- составляло 85/15) становится невозможным идентифицировать пик *цис*- формы или привести большую погрешность при установлении ее содержания.

Использование в качестве подвижных фаз систем на основе метанола не позволяет достигнуть высоких чувствительности и селективности исследуемых родентицидных компонентов модельного раствора. Подобное обстоятельство является, по-видимому, следствием обменных процессов (сдвигом таутомерного равновесия для зоокумарина в сторону открыто-цепочечных форм [3]).

Отдельно стоит остановиться на возможностях определения соотношения геометрических изомеров (*транс*-/*цис*-) в субстанциях родентицидов. При параллельном исследовании технических субстанций китайского и корейского производств, а также аналитических стандартов был выявлен значительный разброс в содержании более активных *транс*- изомерных форм [38]. Иллюстрацией этого может служить субстанция флюкумафен, соотношение изомерных форм (*транс*-/*цис*-) для которой составляет в аналитическом стандарте Fluka – 60/40 (рис. 3А), техническом образце и стандарте Kukbo Science Co, Ltd – 55/45 (рис. 3Б), тогда как для технической субстанции Waycome Pharmaceutical Co, Ltd – 85/15 (рис. 4). Идентификация изомерных форм при проведении анализа субстанции дифенакум более информативна, поскольку разница в токсичности изомеров более существенна (табл.). Соотношение изомеров *транс*- и *цис*-, обнаруженное для субстанции (производства Hangzhou Yuhao Chemical Technology Co, Ltd) и аналитического стандарта Fluka различно (60/40 и 55/45 соответственно), что позволяет судить о более низкой токсичности (см. табл.) приманок на основе технической субстанции по сравнению с гипотетической композицией, приготовленной с использованием аналитического стандарта.

Близкий изомерный состав (*транс*-/*цис*-) был зафиксирован для субстанции бродифакум в готовом [4] средстве (57/43) и аналитическом стандарте ГСО (52/48) российского производства (см. рис. 5А). В первом случае полярность подвижной фазы была подобрана с тем расчетом, чтобы появилась возможность одновременно определить помимо изомеров бродифакума дополнительно родентицидную субстанцию зоокумарин, а также инсектицид фентион [4].

Изомеры субстанции бромадиолон (или же различные формы) недостаточно хорошо раз-

деляются в слабнокислых и нейтральных условиях (см. рис. 5Б). Авторы [21] достигают отличного разделения изомеров субстанции бромадиолон в обращенно-фазовом режиме (флюориметрическое детектирование) при щелочных условиях ( $\text{pH} \geq 8$ ), что может приводить к образованию анионных форм. Тем не менее содержание изомерных форм, полученное нами для субстанции при подкислении (можно оценить ~80/20) совпадает с результатами, полученными в щелочных условиях [21]. Определение изомерного состава данной субстанции в разбавленных растворах (менее 0.045 мг/мл) при использованных нами условиях оказалось невозможным.

Необходимо подчеркнуть, что используемое нами оборудование не позволило провести разделение оптических изомеров титульных веществ. Подобные исследования возможно осуществлять только с привлечением стационарных хиральных хроматографических фаз (см. выше), поэтому изомеры куматетралила и зоокумарина нами не были зафиксированы.

*Валидационные процедуры и балльная оценка поставщиков.* Осуществлению корректных валидационных процедур при внедрении аналитических хроматографических методов контроля продукции в рамках гармонизации с международными нормами способствует соблюдение перечня требований СІРАС/4105/R [9, 19]. При этом важно понимать, что процедура валидации не сводится к «стандартизации» с закупкой расходных материалов и оборудования в точности соответствующим валидируемым, а в первую очередь, направлена на получение данных о специфичности, точности, чувствительности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. На следующем (за внедрением метода) этапе необходимо постоянно осуществлять мониторинг характеристик, установленных в процессе валидации, что достигается участием в межлабораторных сличительных испытаниях и проведением внутренних процедур контроля в соответствии с утвержденными документами системы менеджмента качества на предприятии/организации.

Методика оценки поставщиков (как действующих, так и потенциальных) родентицидных субстанций в рамках ISO 9001 (п. 8.4. Управление внешне поставляемыми процессами, продукцией и услугами [6]) лучшим образом может быть представлена введением балльной шкалы оценки. Например, выбор поставщиков может осуществляться по следующим критериям. При первичной закупке: результаты оценки качества контрольных образцов, цена, наличие системы контроля качества субстанции у производителя (протокол анализа),

готовность поставщика реагировать на претензии по качеству субстанции, наличие дополнительных сертификатов/заклучений. При повторной (текущей) закупке: стабильность качества закупленной продукции, цена, выполнение обязательств по объемам и срокам поставок, реакция поставщика на претензии по качеству поставляемой продукции, сопровождение поставки (документы, упаковка и маркировка товара). В соответствии с введенной шкалой выставляется оценка по каждому пункту (можно вводить дифференцированные шкалы для разных показателей) и суммарная оценка поставщика, которую можно ранжировать в баллах. Тогда для оценки стабильности качества покупаемых субстанций необходимо вести журнал регистрации качества поставок, в котором также отражается наличие несоответствий по каждой поставке, корректирующие мероприятия и переписка с поставщиком. Используя полученный рейтинг оценки поставщиков с общими для всех критериями, в дальнейшем легко составить и актуализировать реестр поставщиков. Поскольку титульные родентицидные субстанции являются веществами первого класса опасности [1] и не производятся на территории Таможенного союза [5], то создание такой базы данных и ее доступность для всех заинтересованных сторон (например в рамках совета производителей дезсредств) стимулировало бы поставщиков в представлении на рынок преимущественно высокоактивных производных и оградило от субстанций с ненужным изомерным балластом, полученным по старым технологическим схемам.

### Заключение

На примере данного исследования показана возможность одновременного мониторинга основных родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда для шести производных с определением изомерного состава для трех из них (дифенакум, бродифакум и флокумафен) при помощи метода ОФ ВЭЖХ на оборудовании, доступном большому кругу исследовательских и производственных организаций. Выявлены значительные отклонения в содержании геометрических изомеров титульных соединений разных поставщиков, при этом наибольший разброс был зафиксирован для флокумафена (содержание *цис*-формы варьировалось от 45 до 15%). Наличие хроматографических данных, содержащих сведения о соотношении изомеров в сырье/готовой продукции, может одновременно служить паспортом качества, подтверждающим содержание действующих веществ, позволяет оценить относительную токсичность без проведения дорогостоящих и длительных процедур биоконтроля, а также предоставляет допол-

нительную защиту производителю/поставщику от фальсификата. Последнее крайне важно, поскольку при осуществлении мониторинга с привлечением хроматографического оборудования будут оперативно выявляться факты использования сырья с меньшим содержанием активных геометрических изомеров и попутно оцениваться микропримеси. Рассмотрена возможность оценки поставщиков субстанций с введением дифференциальной рейтинговой шкалы (балльная система), при этом вклад хроматографических методов в такую оценку наиболее значим, поскольку при соблюдении необходимых требований именно он будет иметь судебные перспективы при возникновении арбитражных споров.

### Список использованной литературы References

**1. Заева Г. Н., Березовский О. И., Родионова Р. П., Рыльников В. А., Хляп Л. А.** Классификация опасности и токсикологическая оценка родентицидов при использовании различными контингентами // Дезинфекционное дело. – 1997. – №4. – С. 24-28/ Zaeva G. N., Berezovskij O. I., Rodionova R. P., Ryl'nikov V. A., Hljap L. A. Klassifikacija opasnosti i toksikologicheskaja ocenka rodenticidov pri ispol'zovanii razlichnymi kontingentami // Dezinfekcionnoe delo. – 1997. – №4. – S. 24-28.

**2. Заева Г. Н., Мальцева М. М., Березовский О. И.** Риск вторичных отравлений нецелевых видов при использовании дератизационных средств // Дезинфекционное дело. – 2004. – №3. – С. 58-64/ Zaeva G. N., Mal'ceva M. M., Berezovskij O. I. Risk vtorichnyh otravlenij necelevyh vidov pri ispol'zovanii deratizacionnyh sredstv // Dezinfekcionnoe delo. – 2004. – №3. – S. 58-64 (in Russian).

**3. Кочетов А. Н., Кузьмина Л. Г.** Строение и таутомерные превращения замещенных в третьем положении 4-гидроксикумаринов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44. – №2. – С. 9-14/ Kochetov A. N., Kuz'mina L. G. Stroenie i tautomernye prevrashhenija zameshennyh v tret'em polozhenii 4-gidroksikumarinov (obzor) // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. – 2010. – T. 44. – №2. – S. 9-14 (in Russian).

**4. Кочетов А. Н., Шестаков К. А., Шпилевский Г. М., Кузьмина Л. Г.** Особенности определения содержания замещенных в третьем положении 4-гидроксикумаринов в дезинфекционных средствах и фармпрепаратах // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47. – №2. – С. 41-50/ Kochetov A. N., Shestakov K. A., Shpilevskij G. M., Kuz'mina L. G. Osobennosti opredelenija sodержanija zameshennyh v tret'em polozhenii 4-gidroksikumarinov v dezinfekcionnyh sredstvax i farmpreparatax // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. – 2013. – T. 47. – №2. – S. 41-50

polozhenii 4-gidroksikumarinov v dezinfekcionnyh sredstvakh i farmpreparatah // Himikofarmaceuticheskij zhurnal. – 2013. – T. 47. – №2. – S. 41-50.

**5. Махнева Т. В., Чепко В. И., Захарченко А. В. и др.** Вклад отечественных производителей средств дезинфекции, дезинсекции и дератизации в развитие дезинфекционного дела в Российской Федерации // Дезинфекционное дело. – 2006. – №3. – С. 17-22 / Mahneva T. V., Chepko V. I., Zaharchenko A. V. i dr. Vklad otechestvennyh proizvoditelej sredstv dezinfekcii, dezinfekcii i deratizacii v razvitie dezinfekcionnogo dela v Rossijskoj Federacii // Dезинфекционное дело. – 2006. – №3. – С. 17-22 (in Russian).

**6. Международный стандарт ISO 9001:2015.** Системы менеджмента качества. Требования / Mezhdunarodnyj standart ISO 9001:2015. Sistemy menedzhmenta kachestva. Trebovanija (in Russian).

**7. Назаров В. Ю., Дацкевич А. М., Кабай Л. И.** Приготовление отравленных приманок силами дезинфекционных учреждений. Проблемы и пути решения // Дезинфекционное дело. – 2011. – №3. – С. 26-35 / Nazarov V. Ju., Dackevich A. M., Kabaj L. I. Prigotovlenie otravlennyh primanok silami dezinfekcionnyh uchrezhdenij. Problemy i puti reshenija // Dезинфекционное дело. – 2011. – №3. – С. 26-35.

**8. Р 4.2.2643-10 Методы лабораторных исследований** и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, – 2010, – 615 с / R 4.2.2643-10 Metody laboratornyh issledovanij i ispytanij dezinfekcionnyh sredstv dlja ocenki ih jeffektivnosti i bezopasnosti – M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, – 2010, – 615 s (in Russian).

**9. Сычев К. Ю.** Оформление методик высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с международными рекомендациями // Аналитика. – 2012. – Т. 2. – № 3. – С. 60-66 / Sychev K. Ju. Oformlenie metodik vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii (VJeZhH) v sootvetstvii s mezhdunarodnymi rekomendacijami // Analitika. – 2012. – Т. 2. – №3. – С. 60-66 (in Russian).

**10. Abe I., Nagamatsu D., Nakahara T., Fabiany G.** Separation of warfarin enantiomers by capillary gas chromatography with chiral stationary phase // Chem. Lett. – 2004. – V. 33. – № 3. – P. 260-261.

**11. Bargmann-Leyder N., Tambuté A., Bégos A.** Synthesis and mechanistic study of novel: t-basic chiral stationary phases derived from tyrosine // Chromatogr. – 1993. – V. 37. – № 7/8. – P. 433-443.

**12. Breckenridge A. M., Cholerton S., Hart J. A. D., Park B. K., Scott A. K.** A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit // Br. J. Pharmac. – 1985. – V. 84. – P. 81-91.

**13. Cai X.-X., Zhang X.-Y.** Simultaneous determination of eleven rodenticides in human plasma and urine using ultra performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry // Chin. J. Analyt. Chem. – 2010. – V. 38. – №10. – P. 1411-1416.

**14. Chu Y.-Q., Wainer I. W.** The measurement of warfarin enantiomers in serum using coupled achiral/chiral, high-performance liquid chromatography (HPLC) // Pharm. Res. – 1988. – V. 5. №0. – P. 680-683.

**15. Eutwistle I. D., Boehm P.** Anti-coagulants of the 4-hydroxycoumarin type and rodenticidal compositions (baits) comprising such anti-coagulants: pat. 4520007 U.S. № 504348; filed 14.06.1983; date 28.05.1985, 15 pp <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009005906> – cor1#cor1.

**16. Fauconnet V., Pouliquen H., Pinault L.** Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver // J. Analyt. Toxicol. – 1997. – V. 21. – P. 548-553.

**17. Hadler M. R., Redfern R., Rowe F. P.** Laboratory evaluation of difenacoum as a rodenticide // J. Hygiene. – 1975. – V. 74. – P. 441-448.

**18.** <http://www.chemicalbook.com>

**19.** <http://www.cipac.org/document/Guidance%20Documents/gclcmeth.pdf> Guidelines for the design of chromatographic analytical methods intended for CIPAC collaborative study.

**20. Hunter K.** High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide in animal tissues // J. Chromatogr. – 1985. – V. 321. – P. 255-272.

**21. Hunter K., Sharp E. A., Newton A.** Determination of diastereoisomers of bromadiolone, an anticoagulant rodenticide, in animal tissues by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1988. – V. 435. – №1-2. – P. 83-95.

**22. Jeyaray G. L., Porter W. R.** New method for the resolution of racemic warfarin and its analogues using low-pressure liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1984. – V. 315. – P. 378-383.

**23. Jones A.** HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 1996. – V. 56. – P. 8-15.

**24. Jung J.-C., Jang S., Oh S., Park O.-S.** Simple synthesis and biological evaluation of flocoumafен

and its structural isomers // *J. Chem. Sci.* – 2010. – V. 122. – №6. – P. 833-838.

**25. Jung J.-C., Lim E., Lee Y., Min D., Ricci J., Park O.-S., Jung M.** Total synthesis of flocoumafen via Knoevenagel condensation and intramolecular ring cyclization // *Molecules.* – 2012. – V. 17. – P. 2091-2102.

**26. Karlsson C., Wikström H., Armstrong D. W., Owens P. K.** Enantioselective reversed-phase and non-aqueous capillary electrochromatography using a teicoplanin chiral stationary phase // *J. Chromatogr.* 2000. – V. 897(A). – P. 349-363.

**27. Kelly M. J., Chambers J., MacNicol A. D.** Simple and rapid method for the determination of the diastereomers of difenacoum in blood and liver using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr.* – 1993. – V. 620. – №1. – P. 105-112.

**28. Moran S.** The efficacy of the flocoumafen wax block bait to control the field rodents *Microtus guentheri* and *Meriones tristrami* // *Crop Protection.* – 2001. – V. 20. – P. 529-533.

**29. Mundy D. E., Machin A. F.** Determination of the rodenticide difenacoum in biological materials by high-pressure liquid chromatography with confirmation of identify by mass spectrometry // *J. Chromatogr.* – 1977. – V. 139. – № 2. – P. 321-329.

**30. Okamoto Y., Aburatani R., Hatano K., Hatada K.** Optical resolution of racemic drugs by chiral HPLC on cellulose and amylose tris(phenylcarbamate) derivatives // *J. Liq. Chromatogr.* – 1988. – V. 11. – №9-10. – P. 2147-2163.

**31. Park O. S., Jang B. S.** Synthesis of 4-hydroxycoumarin derivatives-I: an efficient synthesis of flocoumafen // *Arch. Pharm. Res.* – 1995. – V. 18. – №4. – P. 277-281.

**32. Shadbolt R. S., Woodward D. R., Birchwood P. J.** Synthesis of some tetrahydronaphthyl- and flavanyl-coumarins // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* – 1976. – P. 1190-1195.

**33. Svensson L. A., Owens P. K.** Enantioselective supercritical fluid chromatography using Ristocetin A chiral stationary phases // *Analyst.* – 2000. – V. 125. – P. 1037-1039.

**34. Thacker J. R. M.** An introduction to arthropod pest control. – Cambridge: Universiti Press. – 2002. – 380 p.

**35. van Heerden P. S., Bezuidenhoudt B. C. B., Ferreira D.** Improved synthesis for the rodenticides, diphenacoum and brodifacoum // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* – 1. – 1997. – P. 1141-1146.

**36. van Heerden P. S., Bezuidenhoudt B. C. B., Ferreira D.** Efficient asymmetric synthesis of the four diastereomers of diphenacoum and brodifacoum // *Tetrahedron.* – 1997. – V. 53. – №17. – P. 6045-6056.

**37. Wang M., Chen F., Guan J., Zhao J., Zhang J., Zhao R.** Synthesis and insecticidal activity of new 4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one derivatives // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. DOI 10.1007/s12010-009-8619-7.

**38. Whittle A. J.** Separation of isomers: pat. 4788297 U.S. № 769492; filed 26.08.1985; date 29.11.1988, 3 pphttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009005906 – cor1#cor1.

**39. Yarabe H. H., Billiot E., Warner I. M.** Enantiomeric separations by use of polymeric surfactant electrokinetic chromatography // *J. Chromatogr.* – 2000. – V. 875(A). – P. 179-206.

#### Evaluation of suppliers of rodenticides substances 4-hydroxycoumarin using the method of RP HPLC

*Nosikova L. A., associate professor Department of Chemistry and Technology of Rare and trace elements and of nanoscale composite materials, Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 119571 Russia*  
*senior researcher A. N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences (IPCE RAS), 31 Leninsky prospect, Moscow 119071, Russia*  
*Kochetov A. N., analytical chemist Chemical-analytical laboratory, CJCS «METTEM-Technology», 3, Parkovaya str., Balashikha, 143900 Russia*

The evaluation possibilities of supplier of rodenticide substances 4-hydroxycoumarin (brodifacoum, difenacoum, flocoumafen, bromadiolone) with the involvement of RP HPLC method are considered. Determination of the isomer composition of the rodenticide substances (ratio of geometric isomers) is suggested as the main assessment criterion. Sample preparation and analysis by RP HPLC method under isocratic mode of model solutions and the test composition, in order to establish the isomeric composition of rodenticide substances used in the «pest control» measures are considered. Optimal conditions and the determination limits of the isomer composition of substances (difenacoum, flocoumafen and brodifacoum), including for the compositions based on six derivatives are founded. Based on the analysis of chromatographic data a rapid assessment of the rodenticides toxicity and the rating of suppliers of substances are suggested.

Keywords: rodenticides, substances, RP HPLC, "pest control", *cis-*, *trans-*, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum, bromadiolone, determination of the composition  
 @Corresponding author e-mail: kochchem@mail.ru